

УДК 616.153.915-39:616-089.583.29-092.9

Л. В. ДОРОХИНА, В. В. ЗИНЧУК

**ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ РАВНОВЕСИЕ У КРЫС
ПРИ ГИПОТЕРМИИ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ**

Известно, что в организме при многих патологических состояниях образование прооксидантов в тканях не уравнивается активностью внутри- и внеклеточных антиоксидантов, т. е. формируется определенный дисбаланс прооксидантно-антиоксидантного равновесия [1]. Одно из таких состояний — глубокая гипотермия, при развитии которой у животных возникает активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижение антиоксидантной защиты организма [2]. Среди факторов, обеспечивающих поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия, важное значение имеет монооксид азота (NO), который является, с одной стороны, важным мессенджером с широким спектром действия в организме [3, 4], а с другой стороны, как свободнорадикальная молекула проявляет свойства прооксиданта либо гасителя радикалов [5]. Прооксидантное действие NO связано с ее способностью образовывать пероксинитрит, который служит мощным инициатором окисления липопротеидов [6]. Установлено, что при гипотермии отмечается существенное изменение активности L-аргинин-NO системы [7]. Вклад NO в поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма при различных температурных воздействиях требует дальнейшего изучения [8, 9]. Цель данной работы — изучение показателей ПОЛ и антиоксидантной системы (АС) в тканях крыс в условиях коррекции L-аргинин-NO системы при действии низкой температуры внешней среды.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 58 лабораторных крысах-самцах массой 230—270 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Гипотермия моделировалась в течение 90 мин путем охлаждения крыс, предварительно наркотизированных нембуталом (50 мг/кг, внутривенно). Животных помещали в ячейки специального бокса, внутри которого циркулировала вода при температуре 17 °С. Животным через наружную яремную вену производили катетеризацию правого предсердия с целью введения препаратов и взятия проб смешанной венозной крови. Для коррекции L-аргинин-NO системы крысам вводили: метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинин (L-NAME) фирмы Sigma, L-аргинин фирмы Sigma, нитропруссид натрия (НПН) фирмы Merck. Было сформировано 6 экспериментальных групп, 1-я — контрольная, внутривенно (в/в) вводили 1 мл 0,9%-ного NaCl. Животных остальных групп подвергали холодовому воздействию, предварительно им в/в вводили в объеме 1 мл следующие препараты: 2-я группа — 0,9%-ный NaCl, 3-я — L-NAME (30 мг/кг), 4-я — НПН (40 мкг/кг/мин), 5-я — последовательно вводили L-аргинин (300 мг/кг) и L-NAME (30 мг/кг), 6-я — L-аргинин (300 мг/кг). Мониторинг ректальной температуры осуществляли электротермометром. Датчик устанавливали в прямую кишку на глубину 5 см.

Измеряли продукты ПОЛ (диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ)) и факторы антиоксидантной защиты (α -токоферол, каталаза) в эритроцитах, печени, почках, легких. Содержание ДК измеряли по изменению образуемых конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [10]. Уровень ОШ определяли по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длине волны возбуждения 344 нм и длине волны эмиссии 440 нм [10] на спектрофлуориметре F-4010 фирмы Hitachi. Содержание α -токоферола определяли по интенсивности флуоресценции гептанового экстракта при длине волны возбуждения 292 нм и длине волны флуоресценции (эмиссии) 325 нм [11] на спектрофлуориметре F-4010 фирмы Hitachi. В качестве стандарта использовался α -токоферол фирмы Sigma. Каталазная активность в биологическом материале оценивалась по количеству израсходованной

перекиси водорода, способной образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс, на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 410 нм [11]. Количество гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом.

Полученные данные обрабатывали на персональном компьютере с помощью методов вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента (статистический пакет Statgraphics). Достоверными считались различия при значениях $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. У крыс (2-я группа), получавших 0,9%-ный NaCl до холодового воздействия, произошло снижение ректальной температуры с $37,8 \pm 0,10$ до $22,5 \pm 0,39$ °C ($P < 0,001$). В опытах с коррекцией L-аргинин-NO системы наблюдалось наименьшее снижение ректальной температуры у животных, которым предварительно вводили L-аргинин и ее значение составило $24,5 \pm 0,34$ °C ($P < 0,001$). У крыс других групп, получавших препараты, влияющие на L-аргинин-NO систему (L-NAME; НПН; L-аргинин и L-NAME), ректальная температура достоверно не отличалась от 2-й группы ($21,7 \pm 0,29$; $22,5 \pm 0,45$; $22,4 \pm 0,30$ °C соответственно).

Изменения показателей перекисного окисления липидов в тканях крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы ($M \pm m$)

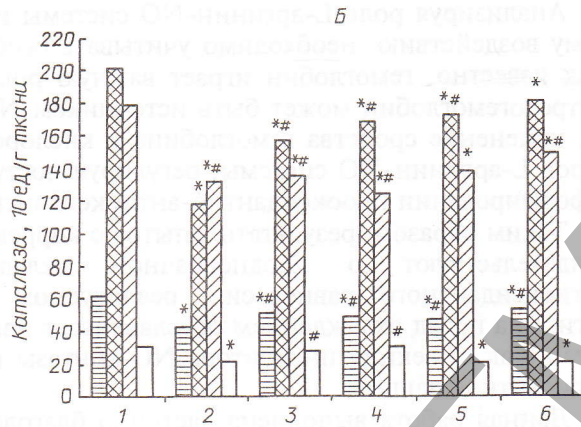
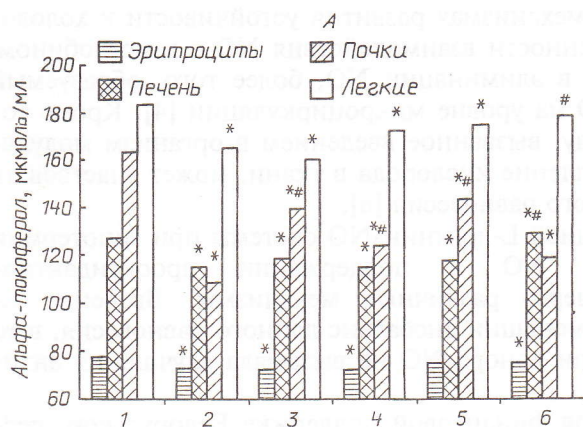
Группа	n	Эритроциты		Печень		Почки		Легкие	
		ДК, $\Delta A_{233}/\text{мл}$	ОШ, ед/мл эр. массы	ДК, $\Delta A_{233}/\text{г ткани}$	ОШ, ед/г ткани	ДК, $\Delta A_{233}/\text{г ткани}$	ОШ, ед/г ткани	ДК, $\Delta A_{233}/\text{г ткани}$	ОШ, ед/г ткани
1. Контроль	10	$3,63 \pm 0,41$	$69,64 \pm 3,23$	$10,59 \pm 0,48$	$189,76 \pm 4,7$	$8,58 \pm 0,41$	$145,4 \pm 1,95$	$5,48 \pm 0,22$	$225,88 \pm 7,07$
2. Гипотермия	11	$6,1 \pm 0,32^*$	$85,42 \pm 2,15^*$	$15,71 \pm 0,56^*$	$272,65 \pm 8,39^*$	$11,71 \pm 0,55^*$	$190,74 \pm 3,62^*$	$8,07 \pm 0,6^*$	$281,95 \pm 5,47^*$
3. L-Name + гипотермия	12	$5,9 \pm 0,67^*$	$110,37 \pm 5,85^{* \#}$	$14,98 \pm 0,56^*$	$236,61 \pm 9,17^{* \#}$	$11,75 \pm 0,78^*$	$217,19 \pm 3,53^{* \#}$	$8,00 \pm 0,39^*$	$278,98 \pm 8,06^*$
4. НПН + гипотермия	8	$4,48 \pm 0,5^{\#}$	$82,78 \pm 2,94$	$15,88 \pm 0,44^*$	$257,96 \pm 9,45^*$	$12,87 \pm 0,74^*$	$215,68 \pm 4,93^{* \#}$	$4,37 \pm 0,13^{* \#}$	$243,31 \pm 6,77^{\#}$
5. L-аргинин + L-Name + гипотермия	10	$7,66 \pm 0,87^*$	$90,25 \pm 2,97^*$	$15,16 \pm 0,52^*$	$226,22 \pm 5,99^{* \#}$	$11,06 \pm 0,58^*$	$179,49 \pm 2,03^{* \#}$	$5,48 \pm 0,55^{\#}$	$277,22 \pm 8,57^*$
6. L-аргинин + гипотермия	7	$4,28 \pm 0,16^{\#}$	$79,53 \pm 1,69^*$	$12,63 \pm 0,33^{* \#}$	$220,09 \pm 3,40^{* \#}$	$10,54 \pm 0,25^*$	$159,3 \pm 2,16^{* \#}$	$6,23 \pm 0,5^{\#}$	$248,68 \pm 9,07^{\#}$

* Достоверные изменения относительно 1-й группы.

Достоверные изменения относительно 2-й группы.

В таблице приведены данные об изменении показателей ПОЛ в тканях (эритроциты, печень, почки, легкие) экспериментальных групп крыс. Установлено, что в эритроцитах крыс 2-й группы (гипотермия+0,9%-ный NaCl) количество ДК достоверно повышалось по сравнению с контролем на 68,0% ($P < 0,001$). В группе, получавшей L-аргинин, происходило наименьшее повышение количества ДК в эритроцитах (17,9%) относительно контрольной группы. У крыс, получавших 0,9%-ный NaCl до холодового воздействия (2-я группа), количество ОШ в эритроцитарной массе увеличилось на 22,0% ($P < 0,001$), в то время как предварительное введение L-NAME вызывало увеличение количества ОШ на 58,5% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем. Наименьшее увеличение количества ОШ на 14,2% наблюдалось при введении L-аргинина. В печени крыс при гипотермии наблюдалось увеличение количества ДК на 48,3%, а ОШ — на 43,7% по сравнению с контрольными животными ($P < 0,001$). Наименее выраженный прирост активности ПОЛ в печени наблюдался у животных, получавших перед охлаждением L-аргинин (увеличение ДК — на 19,3% ($P < 0,001$), а ОШ — на 16,0% ($P < 0,001$)). В почечной и легочной тканях у крыс, получавших L-аргинин до холодового воздействия, отмечалась схожая динамика прироста ПОЛ (повышение ДК и ОШ составило 22,8; 9,6% и 13,7; 10,1% соответственно).

Изменения показателей АС в тканях в условиях коррекции L-аргинин-NO системы приведены на рисунке. Во 2-й группе (0,9%-ный NaCl + гипотермия) наблюдалось достоверное снижение показателей АС во всех исследуемых тканях. Количество α -токоферола в эритроцитах, печени, почках, легких у крыс этой группы уменьшалось соответственно на 6,8% ($P < 0,05$), 9,9% ($P < 0,001$), 33,9% ($P < 0,001$), 10,2% ($P < 0,05$) относительно контрольных животных. Активность каталазы в этих же тканях снижалась соответственно на 33,7%



Изменения показателей антиоксидантной защиты (содержание α -токоферол (А) и активность каталазы (Б)) в тканях у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы: 1 — контроль ($n = 10$); 2 — гипотермия + 0,9%-ный NaCl ($n = 11$); 3 — L-NAME + гипотермия ($n = 12$); 4 — НПН + гипотермия ($n = 8$); 5 — L-аргинин + L-NAME + гипотермия ($n = 10$); 6 — L-аргинин + гипотермия ($n = 7$); звездочка — достоверные изменения относительно 1-й группы; значок (#) — достоверные изменения относительно 2-й группы

($P < 0,001$), 41,5% ($P < 0,001$), 26,9% ($P < 0,001$), 31,9% ($P < 0,001$). Следует отметить, что введение L-аргинина сопровождалось менее выраженным снижением показателей АС в сравнении с другими группами, получавшими препараты влияющие на L-аргинин-NO систему. Так, в эритроцитах 6-й группы отмечалось снижение каталазной активности на 12,9% ($P < 0,05$); в гомогенате печени количество α -токоферол приближалось к контролю, а активность каталазы была ниже контрольной группы только на 10,0% ($P < 0,01$); в почках активность каталазы снижалась на 17,0% ($P < 0,001$); в ткани легкого количество α -токоферол ниже контроля на 2,5%.

Результаты проведенных нами исследований показывают, что гипотермия крыс (снижение температуры тела более чем на 15°C) сопровождается существенными нарушениями прооксидантно-антиоксидантного равновесия. У всех животных, подвергавшихся холодовому воздействию, наблюдалась активация процессов ПОЛ и уменьшение факторов антиоксидантной защиты. В условиях глубокой гипотермии наступает истощение адаптационных механизмов, приводя к серьезным нарушениям метаболизма и возникновению гипоксии [12]. Прирост продуктов ПОЛ и снижение антиоксидантного потенциала тканей было наименьшим у крыс, получавших L-аргинин, естественный предшественник NO в организме. Существенно, что в группах, получавших НПН и L-аргинин, выявлены различные изменения показателей ПОЛ. Возможно, это обусловлено тем, что при введении L-аргинина, помимо NO, образуется одновременно L-цитруллин, который затем вновь ресинтезируется, пополняя внутриклеточные запасы L-аргинина. Введение НПН (донор NO) вызывает образование избыточного количества NO, который при взаимодействии с O_2^- генерирует пероксинитрит, мощный окислитель [6].

Наблюдаемое в наших экспериментах антиоксидантное действие L-аргинина может быть обусловлено образуемым NO и последующим его взаимодействием с O_2^- и H_2O_2 в условиях, при которых его главным эффектом является устранение этих радикалов [13]. NO в данном случае действует как эндогенный гаситель свободных радикалов и в его присутствии цитотоксичность O_2^- или H_2O_2 заметно сокращается [14]. В то же время этот эффект, возможно, связан и с тем, что непосредственно L-аргинин, обладая антиоксидантными свойствами, предупреждает истощение антиоксидантного потенциала организма [15]. Известно, что в опытах *in vitro* экзогенный L-аргинин при введении в реперфузат в условиях глубокой гипотермии значительно улучшает восстановление механической функции сердца и коронарного кровотока путем стимуляции выработки NO [16]. Наблюдаемое в наших опытах меньшее снижение количества α -токоферол у крыс, получавших L-аргинин, в свою очередь содействует утилизации свободных радикалов и модифицирует активность антиоксидантных ферментов, оказывая стабилизирующий эффект на мембраны, ограничивая проникновение активных форм кислорода в глубь гидрофобного слоя мембраны [2].

Анализируя роль L-аргинин-NO системы в механизмах развития устойчивости к холодовому воздействию, необходимо учитывать особенности взаимодействия NO с гемоглобином. Как известно, гемоглобин играет важную роль в элиминации NO, более того, образуемый нитрозогемоглобин может быть источником NO на уровне микроциркуляции [4]. Кроме того, изменение сродства гемоглобина к кислороду, вызванное введением в организм модуляторов L-аргинин-NO системы, регулируя поступление кислорода в ткани, может участвовать в формировании прооксидантно-антиоксидантного равновесия [8].

Таким образом, результаты опытов с коррекцией L-аргинин-NO системы при гипотермии свидетельствуют о неоднозначном вкладе NO в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия, реализуемом через различные механизмы. Введение L-аргинина перед охлаждением обуславливает наименьший дисбаланс данного равновесия, в то время как инъекция ингибитора NO-синтазы или донора NO не вызвала улучшения антиоксидантной защиты.

Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Б97-385).

Summary

The aim of the work was to study the indices of lipid peroxidation and antioxidant system in rat tissues (red blood cells, liver, kidneys, lungs) under conditions of L-arginine-NO system correction and low environmental temperature. The correction of L-arginine-NO system was performed by intravenous administration of N^G-nitro-L-arginine methyl ester, L-arginine, sodium nitroprusside to rats before the cooling. The deep hypothermia was shown to be accompanied with a substantial worsening of prooxidant-antioxidant balance. The administration of L-arginine before a cooling resulted in the smallest prooxidant-antioxidant disbalance, while the infusion of NO inhibitor or donor did not cause an improvement of antioxidant defense.

Литература

1. Favier A. // Ann. Biol. Clin. 1997. Vol. 55. P. 9–16.
2. Василькова Т. У., Кухта В. К. // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. 1988. № 5. С. 64–76.
3. Гурин А. В. // Успехи физиол. наук. 1997. Т. 28. С. 53–61.
4. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицин Н. С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М., 1997.
5. Зинчук В. В., Борисюк М. В. // Здравоохранение Беларуси. 1996. № 11. С. 47–50.
6. Pryor W. A., Squadrito G. L. // Am. J. Physiol. 1995. Vol. 268. P. L699–L722.
7. Steiner A. A., Carnio E. C., Antunes-Rodrigues J., Branco L. G. // Am. J. Physiol. 1998. Vol. 275. P. R937–R941.
8. Zinchuk V. V. // Respiration. 1999. Vol. 66. P. 448–454.
9. Висмонт Ф. И., Зинчук В. В. // Докл. НАН Беларуси 1999. № 1. С. 96–99.
10. Rice-Evans C. A., Diplock A. T., Symons M. C. R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. Elsevier, 1991.
11. Aruoma O. I., Cuppett S. L. Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts. AOCS Press, 1997.
12. Alfaro V., Peinado V. I., Palacios L. // Respir. Physiol. 1995. Vol. 100. P. 139–149.
13. Gaboury J., Woodman R. C., Granger D. N. et al. // Am. J. Physiol. 1993. Vol. 265. P. H862–H867.
14. Wink D. A., Cook J. A., Pacelli R. et al. // Toxicology Letters. 1995. Vol. 82/83. P. 221–226.
15. Львова С. П., Горбунова Т. Ф., Абаева Е. М. // Вопр. мед. химии. 1993. Т. 39. С. 21–24.
16. Amrani M., Gray C. C., Smolenski R. T. et al. // Circulation. 1997. Vol. 96. P. 274–279.

Гродненский государственный
медицинский институт

Поступила в редакцию
01.04.99